

AnnexinVPE/7-AAD 凋亡检测试剂盒

货号: R32130

规格: 20T, 50T, 100T

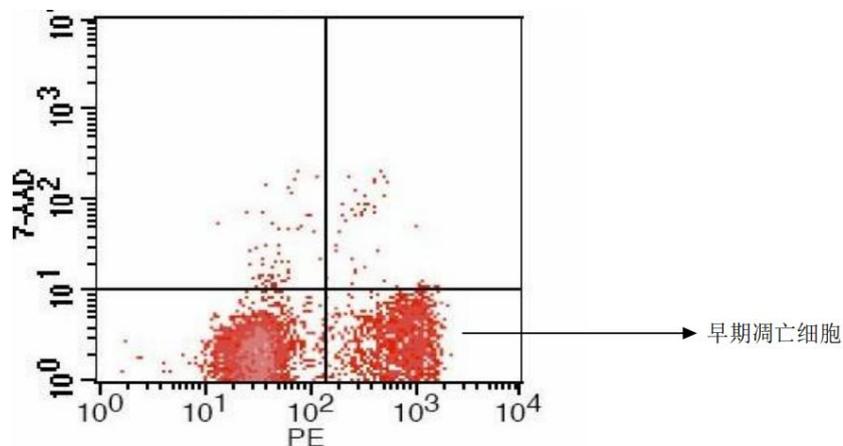
保存温度: 2-8°C, 有效期 12 个月。

产品组成:

产品内容	R32130-20T	R32130-50T	R32130-100T
4x (Binding Buffer 4x)	4ml	10ml	20ml
7-AAD Viability Staining Solution	0.2ml	0.5ml	1.0ml
rhAnnexin V/PE	0.1ml	0.25ml	0.5ml

产品简介:

细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面, 这些细胞膜表面的改变之一是磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜内转移到细胞膜外, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。PS 是一种带负电荷的磷脂, 正常主要存在于细胞膜的内面, 在细胞发生凋亡时细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外。Annexin V 具有易于结合到磷脂类如 PS 的特性, 对 PS 有高度的亲和性。因此, 该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS。PS 转移到细胞膜外不是凋亡所独特的, 也可发生在细胞坏死中。两种细胞死亡方式间的差别是在凋亡的初始阶段细胞膜是完好的, 而细胞坏死在其早期阶段细胞膜的完整性就破坏了。因此, 可以采用 AnnexinV 与 7-AAD 双染的方法, 通过流式检测细胞早期凋亡。



Jurkat 细胞用顺铂诱导凋亡后用 Annexin V-PE/7AAD 双染流式分析图谱

操作步骤:

1、细胞样品的准备:

a)对于贴壁细胞: 小心收集细胞培养液到一离心管内备用。用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心管底, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50 μ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;

b)对于悬浮细胞: 1000rpm 左右离心 5min, 沉淀细胞。对于特定的细胞, 如果细胞无法完全离心至离心管底, 可以适当延长离心时间或稍稍加大离心力。小心吸除上清, 可以残留约 50 μ l 左右的培养液, 以避免吸走细胞。加入约 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS, 重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清;

2、用去离子水按 1:3 稀释结合缓冲液(4ml 4x 结合缓冲液+12ml 去离子水);

3、用 1x 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml;

4、取 100 μ l 的细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5 μ l Annexin V/PE 混匀后于室温避光孵育 5 分钟;

5、加入 10 μ l 20ug/ml 的 7AAD, 并加 400 μ l PBS, 立刻进行流式检测。

实验设计:

1) 未转染细胞

空白管: 阴性对照组细胞, 不加 Annexin V/PE, 7AAD, 用于调节电压。

单染管: 阳性对照组细胞, 只加 Annexin V/PE 或只加 7AAD, 用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/PE, 7AAD。用空白管和单染管调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

2) 转染 GFP



未转染空白管: 未转染细胞, 不加 Annexin V/PE, 7AAD, 用于调节电压。

未转染单染管: 未转染且有明显凋亡的细胞, 只加 Annexin V/PE 或只加 7AAD, 用于调节补偿。

转染 GFP 空白管: 转染 GFP 对照组细胞, 不加 Annexin V/PE, 7AAD, 用于调节补偿。

检测管: 处理的细胞, 加 Annexin V/PE, 7AAD。调节好电压补偿后, 获得所需要的流式数据。

注意事项:

1、Annexin V 是与磷脂酰丝氨酸(PS)亲和, 而 PS 在不同种属间没差异。在正常细胞中, PS 只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 而在细胞凋亡早期, PS 由脂膜内侧翻向外侧。

2、低浓度胰酶消化, 轻柔吹打贴壁细胞 2~3 次, 离心机 4℃1000rpm 5min 离心, 处理得当的话, 胰酶造成损伤可以控制在 5%以内, 有对照组的情况下对实验结果不会造成明显影响。

3、先加 PI 不仅染色是否每组都均匀充分很难判断, 而且 PI 本身对细胞也是有毒性的, 对实验结果影响会比胰酶大, 不建议这样做。

4、Annexin V 是 Ca 依赖的蛋白, 所以不能加入 EDTA, 防止 EDTA 螯合了 Ca 离子从而影响 Annexin V, 进而影响结果。

5、用流式检测凋亡时, 7AAD 受时间的影响很大, 因标记了 7AAD 后会加大细胞毒性, 随着时间延长会导致 7AAD 的染色增加, 特别是检测早期凋亡时, 如果时间延长除了会导致在流式细胞仪上的细胞分群差距加大外, 误差会明显加大。一般 7AAD 加上后立刻上机, 然后在一个小时内检测完成。两种方法都可以, 但是按照我们操作步骤造成的误差会更小。